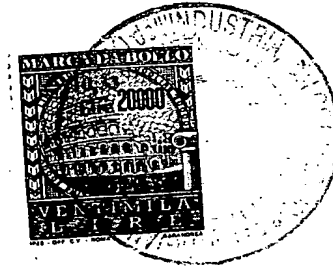




MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO
DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

19/10



INV. IND.

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per

N. MI99 A 000728

| | |
|-------------------|-----|
| REC'D 28 JUL 2000 | |
| WIPO | PCT |

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, Il 10 APR 2000

X IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE

Ing. DI CARLO

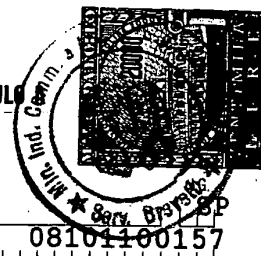
[Handwritten signature]

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **ANTIBIOTICOS S.p.A.**
Residenza **Milano** codice **08101400157**

2) Denominazione _____
Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome **Bianchetti Giuseppe ed altri** cod. fiscale _____
denominazione studio di appartenenza **Bianchetti • Bracco • Minoja s.r.l.**
via **Rossini** n. **8** città **Milano** cap **20122** (prov) **MI**

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/ci/sci) **A61K** gruppo/sottogruppo **31 00**
"uso dell'acido alfa lipoico nel trattamento antimetastatico"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

E. INVENTORI DESIGNATI

1) **Colacci Annamaria** cognome nome
2) **Vaccari Monica**
3) **Cabri Walter** cognome nome
4) **Bernasconi Ermanno**

F. PRIORITÀ

| nazione o organizzazione | tipo di priorità | numero di domanda | data di deposito | allegato S/R | SCIOGLIMENTO RISERVE Data N° Protocollo |
|--------------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------|--|
| 1) _____ | _____ | _____ | ____/____/____ | _____ | ____/____/____ |
| 2) _____ | _____ | _____ | ____/____/____ | _____ | ____/____/____ |

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es. **2**
Doc. 1) ☒ PROV n. pag. **14** riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) ...
Doc. 2) ☒ PROV n. tav. _____ disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare) ...
Doc. 3) ☒ RIS lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale **XXXXXXXXXXXXXX** ...
Doc. 4) ☒ RIS designazione inventore ...
Doc. 5) ☒ RIS documenti di priorità con traduzione in italiano ...
Doc. 6) ☒ RIS autorizzazione o atto di cessione ...
Doc. 7) ☒ nominativo completo del richiedente

SCIOGLIMENTO RISERVE
Data N° Protocollo
____/____/____
____/____/____
____/____/____
confronta singole priorità
____/____/____

8) attestati di versamento, totale lire **09 04 1999** **trecentosessantacinquemila#** obbligatorio

COMPILATO IL **09 04 1999** FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I) **Minoja Fabrizio**

CONTINUA SI/NO **NO**

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO **SI**

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI **MILANO** codice **15**

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA **MI99A 000728** Reg. A.

L'anno millenovecento **NOVANTANOVE**, il giorno **NOVE**, del mese di **APRILE**

il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. **00** fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE
Bidia Minoja

timbro
dell'Ufficio

L'UFFICIALE ROGANTE
CORTONESI MAURIZIO

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA

M/99A000 9

REG. A

DATA DI DEPOSITO

05/1999

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

/ /

A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione

Residenza

D. TITOLO

"USO DELL'ACIDO ALFA LIPOICO NEL TRATTAMENTO ANTIMETASTATICO"

Classe proposta (sez./cl./scl/)

(gruppo/sottogruppo)

L. RIASSUNTO

L'invenzione descrive una applicazione dell'acido alfa lipoico, altresì noto come acido lipoico, acido tiottico o acido 1,2-ditiolan-3-pentanoico, e dei suoi derivati nel controllo della progressione tumorale e nella terapia antimetastatica.

M. DISEGNO



5797 M Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

FM/cv "USO DELL'ACIDO ALFA LIPOICO NEL TRATTAMENTO
ANTIMETASTATICO"

a nome : ANTIBIOTICOS S.P.A.

con sede in: Milano

09 APR. 1999

MI 99 A 000728

* * *

L'invenzione descrive una applicazione dell'acido alfa lipoico, altresì noto come acido lipoico, acido tiottico o acido 1,2-ditiolan-3-pentanoico, e dei suoi derivati nel controllo della progressione tumorale e nella terapia antimetastatica.

STATO DELLA TECNICA

E' universalmente accettata l'ipotesi secondo la quale la cancerogenesi è un processo multifasico in cui si riconoscono almeno tre tappe di sviluppo: iniziazione, promozione e progressione (Rous e Kidd, J. Exp. Med., 73: 365-376, 1941; Beremblum e Shubik, Br. J. Cancer 1: 383-386, 1947; Foulds L., Cancer Res., 14: 327-339, 1954). Nella fase di progressione è selezionata una popolazione di cellule che perdono il controllo della proliferazione ed acquisisce caratteristiche di malignità, dando avvio al processo di metastasi. Spesso la diagnosi ed il trattamento della malattia sono effettuati tardivamente, quando un'alta percentuale di pazienti possiedono già metastasi. In particolare, l'inizio dell'invasione locale che porterà alla disseminazione delle cellule rappresenta la tappa patologica più critica. Un'importante finestra di intervento terapeutico, quindi, può essere individuata nell'intervallo di tempo che intercorre tra lo stadio iperproliferativo e quello invasivo e metastatico (Kohn e Liotta, Cancer Res., 55: 1856-1862, 1995). Il

trattamento con un agente antimetastatico può ritardare o bloccare il processo di invasione e di metastatizzazione, aumentando le possibilità di sopravvivenza. Questi farmaci devono essere somministrati giornalmente e per periodi di trattamento relativamente lunghi.

La maggior parte degli agenti antimetastatici e/o inibitori della progressione tumorale recentemente scoperti (BB2516 Marimastat, BB94 Batimastat, BB3644 (British Biotech), BAY129566 (Bayer), AG3340 (Agouron), CGS27023A (Novartis), RO32-3555 (Roche), D2163, D5410 (Chiroscience), Metastat (CollaGenex) sono di origine sintetica e presentano un'elevata efficacia farmacologica. Questi composti sono accomunati dall'attività di inibizione delle metalloproteinasi, gli enzimi necessari per degradare la membrana basale. Le dosi terapeutiche sono sfortunatamente spesso associate ad effetti tossici (tossicità muscoloscheletrica, epatica, gastrica), che pur consentendone l'impiego in cicli di terapia, ne limitano la somministrazione giornaliera e per lunghi periodi. I cicli terapeutici, inoltre, risultano particolarmente costosi. Un'altra classe di composti con possibile attività antimetastatica è rappresentata da polipeptidi di origine naturale (TIMPs) (Albini, Pathol. Oncol. Res. 4, 3: 230-241, 1998). Queste molecole, ovviamente, non possono essere somministrate per via orale, hanno una bassa permeabilità di membrana, costi elevati.

E' stata riportato che l'acido alfa lipoico, molecola nota per le proprietà antiossidanti ed utilizzato nella pratica clinica come epatoprotettore, può avere applicazione in diverse patologie quali artrite, ulcera, infezione da HIV (EP 427287). L'acido alfa lipoico è una molecola di origine naturale, con scarsi o nulli effetti indesiderati anche a dosi elevate nell'uomo. Esteri

dell'acido alfa lipoico sono stati rivendicati come agenti antineoplastici (CH 683,920) e antitumorali (DE 4400843).

La capacità dell'acido lipoico di inibire trasformazione tumorale di linee cellulari è stata descritta da Calacci et al. E da Silingardi et al., rispettivamente in 88th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, San Diego, California, USA, 12-16 aprile, 1997, e 89th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, New Orleans, Louisiana, USA, 28 marzo - 1 aprile, 1998.

Un tale potenziale effetto chemiopreventivo non permette peraltro di trarre alcuna conclusione circa un potenziale effetto antimetastatico dell'acido lipoico che si esplica non attraverso un meccanismo citotossico o citostatico, ma piuttosto inibendo la capacità di migrazione, adesione e invasività delle cellule.

DEFINIZIONE DEI TERMINI UTILIZZATI

Le seguenti definizioni saranno utilizzate nella descrizione dell'invenzione.

Invasività: Abilità delle cellule di attraversare le barriere anatomiche, quali le membrane basali, lo stroma interstiziale e le giunzioni intercellulari che separano i compartimenti tissutali (Mignatti e Rifkin, *Physiol. Rev.*, 73: 161-195, 1993).

Migrazione: Una delle tappe dell'invasione, la locomozione, che permette alla cellula tumorale di attraversare la membrana basale e lo stroma (Liotta et al., *Sem. Cancer Biol.*, 2: 111-114, 1991).

Chemioinvasione: Risposta invasiva delle cellule allo stimolo di un chemioattrattante.

Mezzo chemioattrattante: miscela di sostanze di origine cellulare in grado di stimolare la migrazione direzionale.

Adesione: Capacità delle cellule di riconoscere e aderire in modo specifico componenti della matrice extracellulare.

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

Sorprendentemente abbiamo scoperto che l'acido alfa lipoico o i suoi sali hanno una elevata attività antimetastatica a dosi micromolari, che si esercita inibendo la chemioinvasione e determinando un aumento della adesione alla matrice extracellulare di cellule tumorali. L'acido alfa lipoico può essere utilizzato come racemato o in forma enantiomericamente pura.

L'attività antimetastatica dell'acido lipoico è stata messa in evidenza usando un modello di chemioinvasione (Albini et al., Cancer Res., 47: 3239-3245, 1987; Reich et al., In: "Alternative Methods in toxicology, Goldberg e Liebert eds., Vol. 7, pp 11-22, 1989), che consente una determinazione rapida, quantitativa e riproducibile del potenziale invasivo e metastatizzante delle cellule maligne e, quindi, un'affidabile identificazione di molecole con attività antimetastatica. Modelli in vitro capaci di mimare il processo di invasione rappresentano un'efficace forma di screening per individuare composti con attività antiinvasiva ed antimetastatica (Hart e Fidler, Cancer Res., 38: 3218-3224, 1978; Liotta et al., Cancer Lett., 11:141-147, 1980; Starkey et al., Cancer Res. 44: 1585-1594, 1984, Mareel et al., Inv. Met. 1: 195-204, 1981). Un ulteriore dato a supporto della attività antimetastatica del prodotto è l'elevata tendenza del prodotto a favorire l'adesione cellulare alla membrana basale. Anche in questo caso è stato utilizzato un modello in vitro standard, (Kato e De Luca, Exp. Cell Research 173, 450-462, 1987; Kato et al., Exp.



Cell Research 179, 31-41, 1988; Kim et al., Inv. Met 14, 1-6: 147-155, 1994-
1995).

Parte sperimentale

Le linee cellulari utilizzate in questo test mostrano fenotipo altamente maligno: fibroblasti murini (BALB/c 3T3) trasformati con i cancerogeni 1,2-dibromoetano (clone F4), 3-metilcolantrene (clone MCA1), benzo (a)pirene (B(a)P), fibroblasti murini (NIH3T3) trasfettate con l'oncogene H-ras (NIH/ras), e la linea di fibrosarcoma umano HT1080.

DESCRIZIONE DEL MODELLO DI CHEMIOINVASIONE

Il test di chemioinvasione è stato condotto in base alla metodologia standard (Albini et al., Cancer Res., 47: 3239-3245, 1987; Melchiori et al., Inv. Met., 12, 1-12, 1992, Adatia et al., Inv. Met., 13: 234-243, 1993; Albini, Pathol. Oncol. Res. 4, 3: 230-241, 1998) utilizzando la membrana basale artificiale Matrigel®. Nel test di chemioinvasione fibroblasti e cellule epiteliali normali, come anche le cellule derivanti da tumori benigni, non riescono a migrare attraverso il coating di Matrigel®. Le cellule maligne, dotate di enzimi specifici deputati alla degradazione della membrana basale, penetrano nel gel e migrano verso la superficie inferiore del filtro dopo 6 ore di incubazione. Il numero di cellule metastatiche che attraversano il Matrigel® è direttamente proporzionale al loro grado di malignità (Albini et al., Cancer Res. 47: 3239-3245, 1987).

Nella tabella è riportato il numero di cellule (per campo) che hanno attraversato la barriera di Matrigel® e la percentuale di inibizione relativa all'esperimento di riferimento utilizzando la media di tre replicazioni.

L'effetto di inibizione è considerato significativo quando la percentuale di inibizione è $\geq 30\%$ (Welch et al., Int. J. Cancer :43, 449-457, 1989).

La Tabella 1 è relativa all'esperimento condotto pretrattando le cellule maligne con acido alfa lipoico. Le cellule al 70% di confluenza sono trattate con una soluzione (da 0,1-100 μM) di acido alfa lipoico ottenuta mediante dissoluzione del prodotto con NaOH 1N. Dopo 16h le cellule sono trattate con tripsina-EDTA (allo 0,05% e 0,02% rispettivamente), risospese in D-MEM al 10% NCS, centrifugate, lavate con D-MEM contenente sieroalbumina bovina (BSA, 0.1%), nuovamente centrifugate e risospese nello stesso terreno. La vitalità ed il numero delle cellule è verificata mediante saggio di esclusione del trypan blue. L'esperimento di invasione viene condotto secondo la metodica standard (Albini et al., Cancer Res. 47: 3239-3245, 1987) utilizzando una sospensione cellulare di $1,5 \times 10^5$ /camera da chemiotassi.

Tabella 1.

Effetto del pretrattamento (16h) con acido alfa lipoico sulla chemioinvasione di cellule murine trasformate chimicamente o per trasfezione.

| Acido lipoico (μM) | DBE/F4 | | MCA1 | | B(a)P | | NIH/ras | |
|---------------------------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| | n° cellule \pm | % inibizione | n° cellule \pm | % inibizione | n° cellule \pm | % inibizione | n° cellule \pm | % inibizione |
| 0 | 116 \pm 3 | | 116 \pm 2 | | 151 \pm 4 | | 174 \pm 6 | |
| 0,1 | 78 \pm 1 | 32 \pm 1 | 77 \pm 1 | 39 \pm 1 | 140 \pm 1 | 7 \pm 1 | 134 \pm 5 | 23 \pm 1 |
| 1 | 60 \pm 1 | 48 \pm 1 | 60 \pm 1 | 48 \pm 1 | 109 \pm 2 | 28 \pm 1 | 102 \pm 2 | 41 \pm 1 |
| 10 | 48 \pm 1 | 28 \pm 1 | 40 \pm 1 | 65 \pm 1 | 86 \pm 3 | 43 \pm 2 | 74 \pm 3 | 57 \pm 1 |
| 100 | 42 \pm 1 | 64 \pm 1 | 30 \pm 1 | 74 \pm 1 | 68 \pm 1 | 55 \pm 1 | 62 \pm 10 | 64 \pm 6 |

La Tabella 2 riporta i dati di un esperimento in cui il test di invasione è stato condotto in presenza di acido alfa lipoico. Le cellule al 70% di

confluenza sono trattate con tripsina-EDTA (allo 0,05% e 0,02%

rispettivamente), risospese in D-MEM al 10% NCS, centrifugate, lavate con D-MEM contenente sieralbumina bovina (BSA, 0.1%), nuovamente centrifugate e risospese nello stesso terreno contenente acido alfa lipoico (conc. 0,1-100 μ M) previamente solubilizzato mediante NaOH 1N. La vitalità ed il numero delle cellule è verificata mediante saggio di esclusione del trypan blue. L'esperimento di invasione viene condotto secondo la metodica standard (Albini et al., Cancer Res. 47: 3239-3245, 1987) utilizzando una sospensione cellulare di $1,5 \times 10^5$ /camera da chemiotassi (0.8 ml).

Tabella 2.

Effetto del trattamento con acido alfa lipoico sulla chemioinvasione di cellule murine trasformate chimicamente o per trasfezione.

| | DBE/F4 | | MCA1 | | B(a)P | | NIH/ras | |
|-----------------------------|----------------------|-----------------|----------------------|-----------------|----------------------|-----------------|----------------------|-----------------|
| Acido lipoico (μ M) | n° cellule ± E.S. | % inibizione | N° cellule ± E.S. | % inibizione | n° cellule ± E.S. | % inibizione | n° cellule ± E.S. | % inibizione |
| 0 | 120 ± 1 | | 102 ± 2 | | 154 ± 2 | | 130 ± 2 | |
| 0,1 | 85 ± 1 | 29 ± 1 | 80 ± 1 | 21 ± 1 | 105 ± 4 | 32 ± 1 | 73 ± 1 | 44 ± 1 |
| 1 | 78 ± 1 | 35 ± 1 | 72 ± 2 | 40 ± 2 | 106 ± 1 | 31 ± 1 | 67 ± 2 | 48 ± 2 |
| 10 | 44 ± 1 | 63 ± 1 | 47 ± 1 | 61 ± 1 | 85 ± 3 | 45 ± 2 | 56 ± 1 | 57 ± 1 |
| 100 | 40 ± 1 | 67 ± 1 | 35 ± 1 | 66 ± 1 | 72 ± 1 | 53 ± 1 | 37 ± 1 | 71 ± 1 |

La Tabella 3 è relativa all'esperimento condotto su una linea di cellule (HT 1080), isolata da un fibrosarcoma umano e ampiamente utilizzata sperimentalmente per le sue caratteristiche (alta invasività e metastaticità).

Le cellule al 70% di confluenza sono state pretrattate con una soluzione (da 0,1-100 μ M) di acido alfa lipoico (ottenuta mediante dissoluzione del prodotto con NaOH 1N), oppure sono state trattate per risospensione dopo il

distacco in terreno D-MEM 10% NCS contenente acido alfa lipoico (0,1-100 μ M). La sperimentazione è stata condotta secondo la metodica standard (Albini et al., Cancer Res. 47: 3239-3245, 1987) utilizzando una sospensione cellulare di $1,5 \times 10^5$ /camera da chemiotassi.

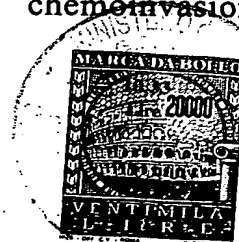
Tabella 3.

Effetto di acido alfa lipoico sulla chemioinvasione di cellule

| Acido lipoico (μ M) | pretrattamento | | trattamento | |
|--------------------------|-----------------------|--------------|-----------------------|--------------|
| | n° cellule \pm E.S. | % inibizione | n° cellule \pm E.S. | % inibizione |
| 0 | 434 \pm 2 | | 438 \pm 2 | |
| 0,1 | 391 \pm 1 | 10 \pm 1 | 387 \pm 5 | 12 \pm 1 |
| 1 | 323 \pm 13 | 26 \pm 3 | 311 \pm 1 | 29 \pm 1 |
| 10 | 311 \pm 3 | 28 \pm 1 | 249 \pm 4 | 43 \pm 1 |
| 100 | 198 \pm 2 | 54 \pm 1 | 188 \pm 4 | 57 \pm 1 |

DISCUSSIONE DEI RISULTATI DEL TEST DI CHEMIOINVASIONE

I risultati dimostrano chiaramente l'effetto anti-invasivo, correlato alla dose, dell'acido alfa lipoico. Il composto inibisce la capacità invasiva di cellule murine maligne ottenute per trasformazione chimica (cloni MCA1 e DBE/F4) o trasformate per trasfezione con un oncogene attivato (NIH/ras). Lo stesso effetto è confermato in cellule derivate da un fibrosarcoma umano. Rispetto al controllo non trattato si nota una inibizione del 30% a dosaggi compresi fra 0.1-1 μ M. Gli stessi risultati sono stati osservati utilizzando per la dissoluzione dell'acido alfa lipoico KOH, tris(idrossimetil)-amminometano o EtOH. L'attività micromolare associata alla non tossicità della molecola indica un'elevata capacità di inibire il processo di chemioinvasione indipendentemente dalla modalità di somministrazione.



DESCRIZIONE DEL TEST DI ADESIONE

Il modello in vitro utilizzato per il test di adesione cellulare, fenomeno fondamentale per il processo metastatico, è stato condotto in conformità a una metodologia largamente utilizzata (Kato e De Luca, *Exp. Cell Research* 173, 450-462, 1987; Kato et al., *Exp. Cell Research* 179, 31-41, 1988; Kim et al., *Inv. Met* 14, 1-6: 147-155, 1994-1995). L'adesione a specifici componenti della membrana basale e della matrice extracellulare del tessuto connettivo è critica per determinare la capacità della cellula tumorale di muoversi attraverso i tessuti fino ai siti secondari dove si insedierà la metastasi. Un'elevata adesione alla matrice indica una minor tendenza a migrare (Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7411-7415, 1981; Varner e Cheresch, *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 724-730, 1996) e quindi un effetto anti-metastatico del prodotto (Glinsky, *Cancer and Met. Rev.*, 17: 177-185, 1998).

Cellule al 70 % di confluenza sono staccate meccanicamente, risospese in D-MEM 0.05% BSA e centrifugate per 2 volte. Le cellule così ottenute sono contate mediante saggio con Trypan-blue e diluite con D-MEM 0.05% BSA contenente acido alfa lipoico (100-500 μ M) in modo da avere una densità di 2×10^5 cell/ml, 1 ml di sospensione cellulare per piastra e incubate per 2 h a 37 °C 5% CO₂. Il coating delle piastre è stato ottenuto secondo la metodologia descritta in letteratura (Kato e De Luca, *Exp. Cell Research* 173, 450-462, 1987; Kato et al., *Exp. Cell Research* 179, 31-41, 1988; Kim et al., *Inv. Met* 14, 1-6: 147-155, 1994-1995) utilizzando come substrati di adesione fibronectina (conc. 3 μ g/ml), laminina (conc. 10 μ g/ml), vitronectina (conc. max 3 μ g/ml), collagene IV (conc. 10 μ g/ml). Le piastre sono quindi lavate 3 volte con terreno di adesione, lavate con PBS, fissate e colorate utilizzando

Crystal-violetto 0.2% in metanolo 20% per 10 min. L'eccesso di colorante è rimosso.

Nelle tabelle è riportata la densità ottica (misurata alla lunghezza d'onda di 560 nm) della soluzione ottenuta solubilizzando con SDS 1 % il colorante fissato alle cellule. La densità ottica risulta pertanto proporzionale al numero di cellule adese al substrato dopo il tempo di incubazione (2 ore). I dati riportati in tabella sono la media della lettura da 3 piastre.

Tabella 4.

Effetto di acido alfa lipoico sull'adesione di cellule trasformate alla laminina (10 µg/ml)

| Acido lipoico (µM) | MCA-1 (densità ottica ± E.S.) | DBE/F4 (densità ottica ± E.S.) | B(a)P (densità ottica ± E.S.) |
|-----------------------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| 0 | 0,284 ± 0,020 | 0,286 ± 0,008 | 0,070 ± 0,007 |
| 100 | 0,262 ± 0,002 | 0,451 ± 0,038 | 0,070 ± 0,006 |
| 250 | 0,314 ± 0,041 | 0,481 ± 0,007 | 0,147 ± 0,004 |
| 500 | 0,468 ± 0,034 | 0,961 ± 0,116 | 0,173 ± 0,014 |

Tabella 5.

Effetto di acido alfa lipoico sull'adesione di cellule trasformate al collagene tipo IV (10 µg/ml)

| Acido lipoico (µM) | MCA-1 (densità ottica ± E.S.) | DBE/F4 (densità ottica ± E.S.) | B(a)P (densità ottica ± E.S.) |
|-----------------------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| 0 | 0,121 ± 0,010 | 0,180 ± 0,004 | 0,135 ± 0,022 |
| 100 | 0,156 ± 0,015 | 0,221 ± 0,014 | 0,251 ± 0,028 |
| 250 | 0,172 ± 0,009 | 0,237 ± 0,035 | 0,299 ± 0,025 |
| 500 | 0,328 ± 0,001 | 0,473 ± 0,09 | 0,575 ± 0,026 |

Tabella 6.

Effetto di acido alfa lipoico sull'adesione di cellule trasformate alla fibronectina (3 $\mu\text{g/ml}$)

| Acido lipoico (μM) | MCA-1 (densità ottica \pm E.S.) | DBE/F4 (densità ottica \pm E.S.) | B(a)P (densità ottica \pm E.S.) |
|------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| 0 | 1,115 \pm 0,035 | 0,559 \pm 0,048 | 0,476 \pm 0,014 |
| 100 | 1,176 \pm 0,019 | 0,614 \pm 0,079 | 0,562 \pm 0,009 |
| 250 | 1,153 \pm 0,025 | 0,734 \pm 0,048 | 0,561 \pm 0,027 |
| 500 | 1,344 \pm 0,025 | 0,944 \pm 0,010 | 0,728 \pm 0,004 |

Tabella 7.

Effetto di acido alfa lipoico sull'adesione di cellule trasformate alla vitronectina (3 $\mu\text{g/ml}$)

| Acido lipoico (μM) | MCA-1 (densità ottica \pm E.S.) | DBE/F4 (densità ottica \pm E.S.) | B(a)P (densità ottica \pm E.S.) |
|------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| 0 | 1,658 \pm 0,045 | 1,400 \pm 0,053 | 0,877 \pm 0,016 |
| 100 | 1,630 \pm 0,100 | 1,434 \pm 0,028 | 1,026 \pm 0,043 |
| 250 | 2,292 \pm 0,072 | 1,732 \pm 0,018 | 1,061 \pm 0,003 |
| 500 | 2,415 \pm 0,030 | 2,199 \pm 0,042 | 1,082 \pm 0,043 |

DISCUSSIONE DEI RISULTATI TEST DI ADESIONE

L'acido alfa lipoico induce una minor tendenza alla migrazione cellulare favorendo l'adesione alla matrice. Infatti a concentrazione 500 μM induce un aumento pari a circa 2,5 volte nell'adesione alla laminina e al collagene IV e pari a circa 1,5 volte nell'adesione a fibronectina e vitronectina.

Da quanto sopra esposto, risulta evidente come l'acido lipoico o suoi analoghi fisiologicamente equivalenti (sali, esteri, solvati, complessi di

inclusione o simili) possa essere vantaggiosamente utilizzato per la preparazione di farmaci antimetastatici.

Per i previsti impieghi terapeutici, l'acido lipoico può essere somministrato per via orale, endovenosa (US 5569670), sottocutanea (WO97/10808) o per alte vie convenzionali di somministrazione (topica, inalatoria, rettale, etc.).

Il dosaggio non è critico alla luce della bassissima tossicità dell'acido lipoico, che può pertanto essere somministrato a dosi molto elevate.

La possibilità di somministrazione orale per lunghi periodi di tempo costituisce ovviamente un notevole vantaggio della presente invenzione.

In linea di massima, la posologia media giornaliera potrà variare da circa 0,5 a circa 5 g, eventualmente suddivisi in più somministrazioni, a seconda del tipo della patologia e delle condizioni del parziale (peso, sesso ed età).

La formulazione dell'acido lipoico in opportune forme di dosaggio può essere effettuata secondo tecniche del tutto convenzionali.



RIVENDICAZIONI

1. Uso di acido alfa lipoico o di suoi derivati fisiologicamente equivalenti per la preparazione di medicinali antimetastatici.
2. Uso secondo la rivendicazione 1 in cui i derivati fisiologicamente equivalenti di acido lipoico sono scelti fra sali, esteri o complessi di inclusione.
3. Uso secondo la rivendicazione 2 in cui il derivato di acido lipoico è un sale farmaceuticamente adatto.
4. Uso secondo una qualunque delle rivendicazioni 1-3 per la preparazione di medicinali antimetastatici somministrabili per via orale, endovenosa o sottocutanea.

Milano, 9 aprile 1999

Il Mandatario
(Minoja Fabrizio)
di Bianchetti • Bracco • Minoja s.r.l.

